

**METHOD AND COMPOSITION FOR THE TREATMENT OF MAMMALIAN HIV INFECTION**

Patent Number: ☐ WO9108753  
Publication date: 1991-06-27  
Inventor(s): VOLKER ERFLE (DE); SAERMARK TORBEN (SE)  
Applicant(s): STRAHLEN UMWELTFORSCH GMBH (DE)  
Requested Patent: JP7005475B  
Application Number: WO1990EP02127 19901207  
Priority Number (s): DE19893940526 19891207  
IPC Classification: A61K37/02  
EC Classification: A61K38/17, C07K14/16D, C07K14/435A4  
Equivalents: AU646652, AU6880891, BR9007904, DK504191T, ☐ EP0504191 (WO9108753), A1, B1, ☐ ES2048137T, GR93300031T, KR9705329  
Cited patent(s): US3856936

---

**Abstract**

---

A method and composition are described for the treatment of mammalian HIV infections including administering an effective subtoxic dosage of melitin to the mammal whereby the growth of HIV infected cells or the replications of the virus in the infected cells of the mammal is inhibited.

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2

## ⑫ 公表特許公報(A)

平5-504761

⑬ 公表 平成5年(1993)7月22日

⑭ Int.Cl.<sup>8</sup>  
A 61 K 37/02⑮ 識別記号  
ADY⑯ 庁内整理番号  
8314-4C⑰ 審査請求有  
予備審査請求有

⑱ 部門(区分) 3(2)

(全 23 頁)

⑲ 発明の名称 哺乳類のHIV感染症の治療のための方法及び組成物

⑳ 特 願 平3-500651

㉑ 出 願 平2(1990)12月7日

㉒ 翻訳文提出日 平4(1992)6月5日

㉓ 国際出願 PCT/EP90/02127

㉔ 国際公開番号 WO91/08753

㉕ 国際公開日 平3(1991)6月27日

優先権主張 ㉖ 1989年12月7日㉗ ドイツ(DE)㉘ P3940526.5

㉙ 発 明 者 フォルカー、エルフル

ドイツ連邦共和国、デー-8000 ミュンヘン  
80, コルベルガー シュトラッセ 7㉚ 出 願 人 ゲーエスエフ・フォルシユンクスツェントルム フュ  
ア ウムベルト ウント ゲズントハイト ゲゼルシ  
ヤフト ミット ベシユレングテル ハフツングドイツ連邦共和国、デー-8042 ノイヘルベ  
ルク、インゴルシュテットター ラントシュ  
トラッセ 1

㉛ 代 理 人 弁理人 青 木 朗 外3名

㉜ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BB, BE(広域特許), BF(広域特許), BG, BJ(広域特許), BR, CF(広域特許), CG(広域特許), CH(広域特許), CM(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域特許), FI, FR(広域特許), GA(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), HU, IT(広域特許), JP, KP, KR, LK, LU(広域特許), MC, MG, ML(広域特許), MR(広域特許), MW, NL(広域特許), NO, RO, SD, SE(広域特許), SN(広域特許), SU, TD(広域特許), TG(広域特許), US

最終頁に続く

## 請 求 の 範 囲

1. 哺乳類におけるHIV感染症の治療のための方法であ  
って:該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチンを投与せしめ、これ  
により、該哺乳類のHIV感染細胞におけるウイルス複製が  
阻害されることを含んで成る方法。2. 哺乳類におけるHIV感染症の治療のための方法であ  
って:該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチンの構造類似体を投  
与せしめ、これにより、該哺乳類のHIV感染細胞における  
ウイルス複製が阻害されることを含んで成る方法。3. 哺乳類におけるHIV感染症の治療のための方法であ  
って:該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチン及びその構造類似  
体のポリペプチド混合物を投与せしめ、これにより、該哺乳  
類のHIV感染細胞におけるウイルス複製が阻害されること  
を含んで成る方法。4. 哺乳類におけるHIV感染症の治療のための方法であ  
って:該哺乳類に、少なくとも1種類の膜タンパク質成分、少なくと  
も1種類の膜タンパク質成分の活性タンパク質成分、少なくと  
も1種類の膜タンパク質成分のポリペプチド成分、及びその混合物より成  
る群から選ばれる薬剤を低毒性有効投与量で投与せしめ、こ  
れにより、哺乳類のHIV感染細胞におけるウイルス複製が

阻害されることを含んで成る方法。

5. 前記の薬剤がメリチンである、請求項4に記載の方法。

6. 前記の薬剤が:

ハチミツ毒素、

マルハナバチ毒素、

スズメバチ毒素、

ボールドフェスオオクマバチ毒素、

該毒素の活性タンパク質成分、

該毒素の活性タンパク質成分、及びその混合物、

より実質的になる群より選ばれる、請求項4に記載の方法。

7. 前記のメリチンの構造類似体が、連結している細胞結  
合性配列を有する又は有さない両親媒性 $\alpha$ ヘリックスを含む、  
請求項2に記載の方法。8. 前記のメリチンの構造類似体が、Gly-Ile-Gly-Ala-Val-  
Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-  
Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly である、請求項2に記載  
の方法。9. 前記のポリペプチド混合物がメリチン及びその構造類  
似体Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-  
Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly  
を含む、請求項3に記載の方法。10. 哺乳類におけるHIV感染症の治療のための方法であ  
って:該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチンを投与せしめ、こ  
れにより該哺乳類におけるHIV感染細胞の増殖が阻害され

ることを含んで成る方法。

11. 哺乳類におけるHIV感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチンの構造類似体を投与せしめ、これにより該哺乳類におけるHIV感染細胞の増殖が阻害されることを含んで成る方法。

12. 前記の構造類似体がAmf11及びメリチン様のCP41のペプチドである、請求項11に記載の方法。

13. 前記の構造類似体がAmf12及びメリチン様のCP41のペプチドである、請求項11に記載の方法。

14. 哺乳類におけるHIV感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチン及びその構造類似体のポリペプチド混合物を投与せしめ、これにより、HIV感染細胞の増殖が阻害されることを含んで成る方法。

15. 哺乳類におけるHIV感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に、少なくとも1種類の膜断層毒素、少なくとも1種類の膜断層毒素の活性タンパク質成分、少なくとも1種類の膜断層毒素のポリペプチド成分、及びその混合物より成る群から選ばれる薬剤を低毒性有効投与量で投与せしめ、これにより、哺乳類におけるHIV感染細胞の増殖が低められる、又は阻害されることを含んで成る方法。

16. 前記の薬剤がメリチンである、請求項15に記載の方法。

の方法であって：

該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチンの構造類似体を投与せしめ、これにより、該哺乳類のレトロウイルス感染細胞におけるウイルス複製が阻害されることを含んで成る方法。

23. 哺乳類におけるレトロウイルス感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチン及びその構造類似体のポリペプチド混合物を投与せしめ、これにより、該哺乳類のレトロウイルス感染細胞におけるウイルス複製が阻害されることを含んで成る方法。

24. 哺乳類におけるHIV感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に、少なくとも1種類の膜断層毒素、少なくとも1種類の膜断層毒素の活性タンパク質成分、少なくとも1種類の膜断層毒素のポリペプチド成分、及びその混合物より成る群から選ばれる薬剤を低毒性有効投与量で投与せしめ、これにより、哺乳類のレトロウイルス感染細胞におけるウイルス複製が低められる又は阻害されることを含んで成る方法。

25. 前記の薬剤がメリチンである、請求項24に記載の方法。

26. 前記の薬剤が：

ハチミツ毒素、

マルハナバチ毒素、

スズメバチ毒素、

ボールドフ<sup>ス</sup>スオオクマバチ毒素、

17. 前記の薬剤が：

ハチミツ毒素、

マルハナバチ毒素、

スズメバチ毒素、

ボールドフ<sup>ス</sup>スオオクマバチ毒素、

該毒素の活性タンパク質成分、

該毒素の活性タンパク質成分、及びその混合物、

より実質的になる群より選ばれる、請求項15に記載の方法。

18. 前記のメリチンの構造類似体が、連結している細胞結合性配列を有する又は有さない両親媒性 $\alpha$ ヘリックスを含む、請求項11に記載の方法。

19. 前記のメリチンの構造類似体が、Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyである、請求項11に記載の方法。

20. 前記のポリペプチド混合物がメリチン及びその構造類似体Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyを含む、請求項14に記載の方法。

21. 哺乳類におけるレトロウイルス感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチンを投与せしめ、これにより、該哺乳類のレトロウイルス感染細胞におけるウイルス複製が阻害されることを含んで成る方法。

22. 哺乳類におけるレトロウイルス感染症の治療のため

該毒素の活性タンパク質成分、

該毒素の活性タンパク質成分、及びその混合物、

より実質的になる群より選ばれる、請求項24に記載の方法。

27. 前記のメリチンの構造類似体が、細胞結合性配列に連結している、又は連結していない両親媒性 $\alpha$ ヘリックスを含む、請求項22に記載の方法。

28. 前記のメリチンの構造類似体が、Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyである、請求項22に記載の方法。

29. 前記のポリペプチド混合物がメリチン及びその構造類似体Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyを含む、請求項23に記載の方法。

30. 哺乳類におけるレトロウイルス感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチンを投与せしめ、これにより、該哺乳類におけるレトロウイルス感染細胞の増殖が阻害されることを含んで成る方法。

31. 哺乳類におけるレトロウイルス感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチンの構造類似体を投与せしめ、これにより、該哺乳類におけるレトロウイルス感染細胞の増殖が阻害されることを含んで成る方法。

32. 前記の構造類似体がAmf11及びメリチン様の

GP41のペプチドである、請求項31に記載の方法。

33. 前記の構造類似体がAmf12及びメリチン様のGP41ペプチドである、請求項31に記載の方法。

34. 哺乳類におけるレトロウイルス感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチン及びその構造類似体のポリペプチド混合物を投与せしめ、これにより、レトロウイルス感染細胞の増殖が阻害されることを含んで成る方法。

35. 哺乳類におけるレトロウイルス感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に、少なくとも1種類の膜糖鎖毒素、少なくとも1種類の膜糖鎖毒素の活性タンパク質成分、少なくとも1種類の膜糖鎖毒素のポリペプチド成分、及びその混合物より成る群から選ばれる薬剤を低毒性有効投与量で投与せしめ、これにより、該哺乳類におけるレトロウイルス感染細胞の増殖が低められる又は阻害されることを含んで成る方法。

36. 前記の薬剤がメリチンである、請求項35に記載の方法。

37. 前記の薬剤が：

ハチミツ毒素、

マルハナバチ毒素、

スズメバチ毒素、

ゴールドフエスオオクマバチ毒素、

該毒素の活性タンパク質成分、

該毒素の活性タンパク質成分、及びその混合物、

## 明 細 書

哺乳類のHIV感染症の治療のための方法及び組成物

### 発明の背景

#### 1. 発明の属する技術分野

本発明は哺乳類のHIV感染症の治療のための方法及び組成物に関し、そしてより詳しくは哺乳類宿主に導入され、そして該哺乳類のHIV感染細胞におけるウイルスの複製を制限又は実質的に阻害することがそれぞれできる膜糖鎖の毒素又はそのタンパク質性もしくはペプチド成分を利用する哺乳類の感染症の治療のためのこのような方法及び組成物に関する。

#### 2. 従来技術の説明

医学者は長い間HIV感染個体の治療のための有用な方法及び組成物を探している。本明細書にてHIV感染症はHIV1及びHIV2感染症の両方を含むことを意図している。この観点において、本研究はHIV感染症と戦うための潜在的に有用な治療薬を探すことを目的とし、ここで該組成物はHIV感染細胞のウイルス再生を阻害しうるが、しかし莫大なる有害な副作用を有さないものである。より詳しくは、本研究の目的は従来のAZTの利用にとって代る治療剤である組成物を見出すことにある。ところでこの組成物は有効性ウイルス細胞のレザーバーを含む又は実質的に制限するた

より実質的になる群より選ばれる、請求項35に記載の方法。

38. 前記のメリチンの構造類似体が、連続している細胞結合性配列を有する又は有さない両親媒性 $\alpha$ ヘリックスを含む、請求項31に記載の方法。

39. 前記のメリチンの構造類似体が、Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyである、請求項31に記載の方法。

40. 前記のポリペプチド混合物がメリチン及びその構造類似体Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyを含む、請求項34に記載の方法。

の、HIV感染細胞もしくは言い換えるならHIV増殖性細胞を選択的に破壊せしめることが可能なものでなくてはならない。

理解される通り、HIVウイルスはレトロウイルスであり、従って最も適切にはRNAウイルスとして分類される。ところで、このような特定のレトロウイルスのRNAはレプリカゼによって直接的に増殖されるのではなく、むしろ逆転写酵素の助成を有するDNA合成の介在を必要とする。理解されている通り、このDNAはRNAウイルスの増殖のための鋳型として働く。このDNAは宿主細胞のゲノムの中に後に一体化する。この一体化の現象はその後、新たなウイルス細胞の生産をもたらす。

低毒性(subtoxic)濃度の膜糖鎖の毒素又はそのタンパク質性もしくはペプチド成分を利用する本発明は、逆転写酵素を阻害せしめることによって低毒性濃度にてウイルス複製を妨害せしめること及び/又はHIV感染細胞の増殖を阻害せしめることにより、多数の長所を伴ってウイルスレザーバーを治療的に実質的になくすものと考えられる。

名称 "METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE TREATMENT OF HEMALIAN INFECTIONS EMPLOYING MEDICAMENTS COMPRISING HYMENOPTERA VENOM OR PROTEINACEOUS OR POLYPEPTIDE COMPONENTS THEREOF" (「膜糖鎖の毒素又はそのタンパク質性もしくはポリペプチド成分を含んで成る医薬品を利用する哺乳類の感染症の治療のための方法及び組成物」) の、1989年4月18日に承認されたBentonらの米国特許第4,822,608

号は、天然の二次因子、例えば膜結合の毒素又はそのタンパク質性もしくはポリペプチド成分が抗菌剤を強める作用を有することを教示している。この文献は更に、このような組成物は種々の疾患における抗ウイルス、抗癌性又は抗癌作用を有することも述べている。より詳しくは、Bentonらの文献はミツバチ毒素の主成分であるメリチン (melittin) を、予め分っている感染症に対して抗ウイルス活性を有する様々な抗生物質と組合せて利用することを開示している。更にこの文献は、種々の治療的に有効な量におけるメリチンと様々な抗生物質との組合せにより相乗的な利点が見られることを教示している。

Bentonらの従来技術文献に詳細に説明されている通り、ミツバチ毒素における主成分であるメリチンは実質的に26個のアミノ酸残基を含むポリペプチドである。これらのアミノ酸残基はGly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-アミドを含む。更に、この発明者は、メリチン類似体であって、少なくともその最後の6個のアミノ酸(C-末端)が変異して6個のグリシン残基に置き代わられているものの直接的な作用が、メリチンに類似する治療的利点を有することを発見している。このアミノ酸類似体は、Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly の構造を有す。

従って、例えばA Z Tにより成し遂げられる常用のHIV治療に関連するそれぞれの有害性を更に回避しながらも、哺

乳類に感染しうるウイルスのリザーバー細胞をなくす又は大いに少なくすることが可能な安全且つ有効な手段におけるHIV感染細胞の治療のための方法及び組成物が長い間所望されていた。

#### 発明の目的及び概要

従って本発明の目的は、膜結合の毒素又はそのタンパク質もしくはペプチド成分を利用する、哺乳類におけるHIV感染症の治療のための改善された方法及び組成物の提供にある。

本発明の他の目的は、哺乳類におけるHIV感染症の治療のためのこのような方法及び組成物であって、ここで膜結合毒素がミツバチ (honey bee) 毒、マルハナバチ (bumble bee) 毒、スズメバチ (yellow jacket) 毒、及びボールドフェースオオクマバチ (bald faced hornet) 毒、該毒の活性タンパク質成分、該毒の活性タンパク質成分並びにその混合物より実質的になる群より選ばれる方法及び組成物の提供にある。

本発明の他の目的は、哺乳類におけるHIV感染症の治療のためのこのような方法及び組成物の提供にあり、ここで該方法は哺乳類に有効な低毒性投与量のメリチンの類似体又はそれ自体を投与せしめることにより、哺乳類のHIV感染細胞におけるウイルス複製を実質的に阻害せしめることを含んでいる。

本発明の他の目的は、哺乳類におけるHIV感染症の治療のためのこのような方法及び組成物の提供にあり、ここで該

方法は哺乳類に有効な低毒性投与量のメリチンとその構造類似体のポリペプチド混合物を投与せしめることにより、HIV感染細胞におけるウイルス複製を阻害せしめることを含んでいる。

本発明の更なる目的及び利点は、哺乳類のHIV感染を治療するための、安全且つ有効であり、そしてこのような疾患の治療のための従来の治療法のそれぞれに関連する有害性を更に回避せしめる、改善された方法及び組成物の提供にある。

#### 図面の簡単な説明

図1はメリチン濃度に依存する未処理コントロールのパーセンテージとしての、非感染及びHIV感染細胞により得られる細胞増殖の比較を示すグラフ図である。

図2はメリチン濃度に依存する未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染Tリンパ球細胞 (KE37-1/II $\beta$ ) の培養上清液の標準細胞系と比較した逆転写酵素の活性 (RT%)、そして更には感染性 (INF%) の比較を示すグラフ図である。

図3はメリチン類似体の濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、非感染及びHIV感染細胞により得られる細胞増殖の比較を示すグラフ図である。

図4は、メリチン類似体の濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染Tリンパ球細胞 (KE37-1-III $\beta$ ) の培養上清液の、標準化細胞系と比較した逆転写酵素の活性 (RT%) 及び感染性 (INF%)

を示すグラフ図である。

図5はHIVウイルスのGP41分子のカルボキシ末端領域のグラフモデルである。

図6はメリチンの濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖の比較を示すグラフ図である。

図7はメリチンの濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図8はメリチン6の濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖の比較を示すグラフ図である。

図9はメリチン6の濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図10はメリチン4の濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図11はメリチン4の濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図12はメリチンEの濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図13はメリチンEの濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図14はメリチンの濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図15はメリチンの濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図16はメリチン3の濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図17はメリチン3の濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図18はメリチン1-20の濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図19はメリチン1-20の濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図20はマストラン(mastoparan)の濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図21はマストランの濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図22はAMF12の濃度により比較した、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図23はAMF12の濃度の関数としての感染性細胞のパーセンテージを示す。AMF11の濃度の関数としての感染性細胞のパーセンテージは図23に示す結果と同一である。

図24はMHCペプチドの濃度により比較する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図25はMHCペプチドの濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図26はDMSO(溶媒コントロール)の濃度により比較した、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図27はDMSO(溶媒コントロール)の濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図28はHOLSTペプチド(陰性コントロール)の濃度により比較した、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図29はHOLSTペプチド(陰性コントロール)の濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図30は種々の時間間隔でメリチンの濃度により比較したP24生産のパーセンテージを示すグラフ図である。

図31は3時間目にてメリチンの濃度にて比較した細胞及び上清液におけるP24生産のパーセンテージを示すグラフ図である。

図32及び33はそれぞれメリチンの存在下において3時間及び14時間インキュベーションせしめた後の細胞と上清液におけるP24の濃度を示すグラフ図である。

図34は種々の濃度のメリチンと3時間及び14時間インキュベーションせしめた後の、それぞれの無細胞上清液中におけるP24測定へのメリチンの効果を示すグラフ図である。

図35は、マウスによる長期毒性試験を示し、より詳しくは特定の毒物の投与を開始してから種々の時間にて得られた、この毒性試験の際に用いた種々の毒物に対するマウスの有効体重を示す記録例である。

図36は毒性試験に用いた物質の投与を開始してから経過日数の関数としての、長期毒性試験におけるマウスの体重を示す記録例である。

図37は投与を開始してから種々の日数でのハチミツ毒物の利用の関数としての、個々のマウスの体重を示す記録例である。

図38は投与を開始してから種々の日数での、スズメバチ

毒物の利用の関数としてのマウスの体重を示す記録例である。

図39は投与を開始してから種々の日数での、オオクマバチ混合物毒物の利用の関数としてのマウスの体重を示す記録例である。

図40は投与を開始してから種々の日数での、スズメバチ混合物毒物の利用の関数としてのマウスの体重を示す記録例である。

図41はマウスについての長期毒性試験を示し、これは毒性試験に従ってハチミツ及びスズメバチ混合物の付与されたマウスの種々の解剖器官それぞれの顕微鏡試験をまとめた記録例である。

図41Aは、図40に紹介する種々のデータの解説を示す。

図42はメリチン及びその構造類似体の構造を示す。

#### 好ましい実施例の説明

##### 材料と方法

##### 材料

以下に詳細のKE37-1(非感染)及びKE37-1/β(感染)細胞系はアメリカ合衆国におけるNIHのDr. Robert Callows研究所より市販され、これを1ミリリットル当たりペニシリン約100ユニット、ストレプトマイシン100μg及びフングゾン(fungisone)(アンフェテリシンB)約0.25μgを含む、10%の仔牛血清を更に添加されているRPMI1640(GIBCO)

の培養に用いた。下記に詳細のヒト間充組織細胞系 LC5 及び LC5-HIV は 1989 年 9 月 9 日にフランス国、パリの Collection De L' Institut Pasteur に寄託されており、それぞれ登録番号 1-842 及び 1-843 が付与されている。LC5 及び LC5-HIV 細胞系を、10% の仔牛血清の添加されている RPMI 1640 培地において培養せしめた。

#### 合成ペプチド

GP41 由来のメリチンペプチド及び類似体は市販されているペプチド合成装置 (Biolyne モデル、Pharmacia Biochrome, Cambridge UK) を用い、この装置 (Pharmacia Biochrome, Cambridge UK) に供給する予め秤量したアミノ酸 OPEP エステルにより合成した。この合成手法は、この装置のためのマニュアルに詳細の通り、Fmoc 手法に基づく。アシル化のレートはバイオプラス (Bio plus) ソフトウエアにより、その反応により付与されたプロトコールに従い、600 nm にてアニオン色素 (アシッドバイオレット 17; ジメチルホルムアミド 100 ml 及びジイソプロピルエチルアミン 0.14 ml 当り 300 µg) の濃度を利用してモニターした。この装置は対イオン分布モニター (Counter ion distribution monitoring: CDM) として知られ、そして Salisbury, S. A., Treemer, E. J., Davies, J. W. 及び Owen, D. E., I. A., (1990)

J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1990 頁 538-540 に詳細されている。利用するリンカーはペプチドアミドの遊離をもたらす (ウルトロシン C) Ultrasyn C, Pharmacia Biochrome, Cambridge UK)。

酸性に不安定なリンカー、ウルトロシン C (0.100g) への第 1 のカップリングを対称無水物 (0.400g) を用い、ジメチルアミノピリジンの添加 (0.0500g) により行った。これは、Fmoc 基の遊離により固定されるものとして、1 時間後に少なくとも 80% のカップリングをもたらす、そして未反応部位は無水酢酸を用いてキャップせしめた。その後のカップリングは、市販されている活性エステル (Pharmacia Biochrome, UK) を用い、利用したソフトウェア (上記) によって自動的に行われる CDM によって決定されるカップリング時間にわたって行った。典型的なカップリング時間は一度に 4 倍過剰量のエステルを用いて 1 時間である。Ser を染色となるジヒドロキシベンゾトリアゾールを用いてカップルせしめた (1.5-2 時間)。Fmoc 基を 5 倍のベッド容量のピペリジン (ジメチルホルムアミド中で 20%) により除去せしめた。ジメチルホルムアミドを僅量に蒸留せしめ、アミンを含まないようにせしめた (Biolyne に関するプロトコールに詳細のジエトロフルオロベンゼン試験により決定した)。これらのカップリングは何ら特別な問題を提供せず、そして粗ペプチドは高圧液体クロマトグラフィー (HPLC、以下参照) により

80% 以上の純度であった。

粗ペプチドを 2% のアニソール及び 2% のエタノール添加を伴ってトリフルオロ酢酸を用い、2 時間かけて細胞から切り出し、その酢酸エーテル沈殿せしめた。このペプチドを TSK120T 逆相カラム (7.5 × 300 mm) (Pharmacia, Sweden) における HPLC により純度 95% 以上に高純度化せしめた。このペプチドは、0.1% のトリフルオロ酢酸中における 0-80% のアセトニトリルの 90 分にわたる勾配を用いることにより、65% のアセトニトリル (55 と 75% の間) にて典型的に抽出させた。この配列をアプライドバイオシステム (Applied Biosystem) シーケンサーにより、両向きに従うタンパク質シーケンシングにより確認した。

GP41 類似体及びマストバランの合成はメリチンについての詳細の通りに行った。利用したメリチン類似体及びその他のペプチドのリストは図 42 に記述した。

#### 方法

図 1-4 をより詳しく説明すると、メリチン及びその特定の類似体を HIV 感染 Tリンパ球細胞へのそれらの作用について試験した。これに関し、以下の細胞系をこの試験において利用した: KE37-1 (非感染) 及び KE37-1/IIβ (HTLV-IIβ により感染)。これらの感染細胞を試験条件のもとで 7 日間をわたり、37℃ の温度及び 5% の CO<sub>2</sub> の存在下においてインキュベートせしめた。RPMI 1640 の培養培地 (GIBCO) を利用し、そして更にこれにペ

ニシリン的 100 ユニット、ストレプトマイシン 100 µg 及びフンギゾン (アンフォテリシン B) 約 0.25 µg を 1 ml 当りに含む 10% の仔牛血清を添加せしめた。これは培地 100 ml 当り、1 ml の抗生物質-抗真菌溶液 (GIBCO: カタログ番号 04305240) に相当する。日々の細胞の全体的な状態の存在下において、1 週間にわたるインキュベーションの後、以下の試験をこの培養物について行った。第 1 の試験は MTT 試験を利用することにより提供される、HIV 感染細胞の両方としての相対細胞反応を測定する目的のために行った。この MTT 試験は T. Mosmann の、"Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays," *Journal of Immunological Methods*, 第 65 号 (1983)、頁 55-63 に従い、マイクロタイタープレート中で行った。この MTT 試験は若干改良した: 10 µl の MTT 溶液 (PBS 中に 50g/ml の MTT を溶解し、通過により除菌した; MTT は 3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミドである) を全てのウェルに加えてある。細胞を MTT と、37℃ で 4 時間、5% の CO<sub>2</sub> の存在下においてインキュベートせしめた。青色の MTT を代謝的に活性な細胞によって染色のホルマゼンへと還元する。この反応をイソプロパノール中における 0.04 N の HCl 200 µl を全てのウェルに加えることにより停止させ、そしてこの色素を抽出せしめる。全てのホルマゼン抽出物を溶解せしめるために得られるこの溶

液を強く混合した。この溶液の吸光度を $\lambda = 600 \text{ nm}$ で測定した。この吸光度はこのような条件下の細胞密度と比例する。

第2の実験はPohlmannらにより詳細のPNAS 77 (1980): 1415-1419に見い出せる試験を改良した方法を利用することにより、処理せしめたHIV感染細胞培養物の上清液中における逆転写酵素の活性を測定するために行った。第3の実験は処理せしめたHIV感染細胞培養物の上清液の相対感染性を測定することを目的として行った。これに関し、非感染性のHIV感受性ヒト胎児肺細胞(LC5)を試験すべき培養上清液中においてインキュベートした。これに続き新鮮培養中でのこの細胞の3日間培養を行った。次にこれらの細胞をHIV特異的タンパク質の生産について試験した。

HIVタンパク質の存在を確認する方法は血清学試験を介して行った。ここでは、第1抗体であるこれらのタンパク質に対する抗体及び第2抗体であるこのイムノグロブリンに特異的な抗体、そしてこれに結合している西洋ワサビペルオキシダーゼを利用している。識別化のため、抗体-抗原複合3-アミノエチルカルバゾールを利用した。この物質は水に不溶性であった。この方法は間接的イムノペルオキシダーゼ比色法としてよく知られる。この方法はMellertらの "HTLV-III/LAV-Antikörper test: Indirekte Immunperoxidasefärbung (HTLV-III/LAV抗体試験: 間接的イムノペルオキシダーゼ染色) AIDS-FORSCHUNG

まとめると、図1-4に示す試験データは、メリチンが低毒性濃度で逆転写酵素を阻害することにより、ウイルス複製を阻害するための治療に有用であることが考えられることを示す。更に、メリチンはHIV感染細胞の増殖を選択的に阻害するものと考えられ、このことは哺乳類におけるウイルスリザーバーの撲滅を可能とする。

図1から4に示す試験結果を更に裏付けするために更なる試験を行った。図6から8.4を参照することにより最もよく説明されるこれらの試験それぞれにおいて、メリチンがHIV感染細胞を阻害する考えられるメカニズムを調べた。序論により及び図5をより詳しく参照することにより、HIVタンパク質GP41の表面のエネルギー最小化試験を、ニューラルネットワークコンピューティング(neural network computing)原理に基づく二次構造予測におけるCHARMプログラムを用いて行った。ここで利用するニューラルネットワークプログラムの用途はアミノ酸配列からの予測二次タンパク質構造であることが理解されるべきである。このネットワークはアミノ酸残基を3つの型の二次構造、即ち、アルファヘリックス、ベータシート及びランダムコイルに分けるようになっている。既知の二次構造を有するタンパク質の大量のセットをこれに教え込むことにより、このニューラルネットワークはこのネットワークにとって新規なるタンパク質の二次構造について、その一次構造に単に基づいて予測することが可能となる。ヒト免疫不全ウイルス(HIVタンパク質GP41)の、ニューラルネ

(AIP) 1986年2月、第2巻、頁105-107に詳細されている。図1-4に見られる通り、メリチンは $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度でHIV感染細胞及び非感染細胞両者に毒性であることがわかる。これに関連して、本試験データの分析を更に補助するためにマウスに対する毒性試験を以降に提供する。以上の他、図3に示される通り特定のメリチン類似体は明らかにメリチンほど毒性でない。しかしながら、この類似体はより高い投与量、即ち $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ でHIV感染細胞に対して選択的な増殖阻害作用を示す。更に、メリチンが感染及び非感染細胞の両者に毒性である濃度 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ にて、感染細胞の増殖はメリチンを利用することによりおよそ7日後にほぼ80%下げるが、非感染細胞の増殖は容易には影響を受けないことを本発明者が発見したことに注目すべきである。

以上の他、図1-4に示す試験データは、 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のメリチンを示し、これでは細胞の増殖のレベルは未だ影響されず、この細胞の感染する能力及び逆転写酵素の活性はほぼ0値に低下することが明らかである。これは図2を参照することにより最もよく分る。

図4を参照することにより最もよく分る試験データは、メリチン類似体が逆転写酵素の活性及び上清液処理化HIV感染細胞における感染性ウイルス細胞の量も低めることができることを示す。この作用は非感染細胞には毒性でないが、HIV感染細胞には明らかに毒性である濃度範囲において生ずるものと考えられる。

ネットワーク法に基づくコンピューターモデル化による分析は、H. Andreasenらの "Analysis of the Secondary Structure of the Human Immunodeficiency Virus (HIV) Proteins p17, gp120 and gp41 by Computer Modeling Based on Neural Network Methods," Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 第3巻、頁615-622に見い出せる。より詳しくは、これらの研究により導かれる考察は、GP41タンパク質の2つのトランスメンブランセクションがメリチンの構造とある程度を同一性を有することを示唆している。これに関して、この同一性はかなり注目すべきであり、その理由はメリチンとはかなり異なっているその他のメリチンの類似体が同じHIV阻害作用を有することが明らかであるからである。従って、メリチンにおけるいくつかのアミノ酸は、両親媒性が保持されることを条件に該分子の活性の変化を伴うことなく交換されることができ、そして4つのメリチン分子のポリマー化が荷電相互作用により可能であることが明らかである。これらのデータから導かれる考察であって以降により詳しく説明することは、即ち、メリチンは主なHIVタンパク質のうちの1つ、糖タンパク質GP41と相互作用するものと考えられることである。これは、GP41のトランスメンブラン領域とメリチンが図5に示す通り類似する理由より考えられる。

メリチンはアミノ酸26個分の長さの両親媒性ペプチドであると考えられる。高いイオン強度の水溶液中では、メリチンは4量体の構造を選択する。しかしながら、低いイオン強度



ではメリチンはモノマーのランダムコイルとなる。生體的なイオン強度ではこの2つの型の分布が等しくなるようである。従来の研究が示すには、メリチンはモノマーヘリックスを形成せしめることにより細胞膜の疎水環境に適合することができることを示している。このヘリックスの一方の側面には電荷が分布し、そして膜に結合している側面には電荷は負荷されていない。この研究は、メリチンポリマーの表面がまわりの脂質に向いており従って電荷が負荷されていないことを更に示唆する。更に、メリチン分子のその他の特有な特徴は、約120°のねじれがプロリン（アミノ酸番号14）によってこのメリチンヘリックスに導入されていることである。類似のねじれが上記のHIV GP41メリチン推配列に見い出せる。

初期の研究は、メリチンがいくつかの作用を有することで知られていることを示す。これらの作用は細胞表面結合プロセス及び重合プロセスとしてより詳細され、ここではアルファヘリックスはチャンネルを形成するように配置している。更に、C末端、即ち尾部の6個のアミノ酸によって結合することは細胞溶解のために重要であることが示されている。この事実は以降に詳細する実験的試験データを理解する上で非常に重要である。メリチンがチャンネルを形成する正確なメカニズムはよく理解されていないことが理解されるべきである。しかしながら、メリチン分子はその塩基性C末端によってリン脂質イオンと結合することが考えられ、これによって10個のホスファチルコリン分子と相互作用する。メリ

チン分子が結合したら、これは膜の外脂質層の中に入り込み、これによって膜の構造を乱すと考えられる。この働きに続き、膜の外層に孔が形成され、これによりイオンの透過性は高められ、その後膜は破れる。この膜において形成されるチャンネルはメリチン分子により安定化される。チャンネルの形成は細胞の溶解ももたらし、これは以降のメリチンの毒性に関連する。これはアルファヘリックス及び補体が細胞毒性であるメカニズムと比較することができる。これらの分子は膜に広がることもでき、これによって同じ結果をもたらす孔が形成される。

チャンネル形成能力を含む両親媒性ペプチドの作用に加え、ホスホリパーゼA2における作用が詳細され、これも二種のタンパク質間の両親媒性相互作用を含む。このケースにおいて、メリチンはおそらく酵素タンパク質ホスホリパーゼA2の疎水部分と相互作用するか、又はそれはメリチン-リン脂質相互作用に起因しうる。以上の他、メリチンの作用は細胞内である可能性もある。例えば、メリチンは成長ホルモンの分泌をもたらす、下垂体前葉製剤における内因性ホスホリパーゼA2を刺激せしめることが知られる。

図6から34にそれぞれ示す一連の実験は両極端を調べるためにデザインされている。これらの試験は特にウイルス避離の障害及び/又は低められた他の細胞への感染能力を有するウイルスの避離を調べるためにデザインされている。他の細胞に感染する低められた能力は、例えばグリコシル化阻害剤により示され、ウイルス避離への直接的な作用はアシル化阻

害剤、RT阻害剤及びメリチンにより示される。ところで、この実験のデザインの最も重要な特徴はメリチンの毒性の検出である。本実験は星状細胞腫細胞系LC5-HIV（クローン化感染細胞）及びリンパ細胞腫細胞系KE37-1/IIβ（HTLV-IIβによるクローン化感染細胞）の両者において行った。両ケースにおける結果は実質的に同じであった。

一連の本実験において、HIV避離は完全自動化研究型ロボットシステムにより試験し、これはBlomtek 100としてBeckman Instrumentsにより製造されている。このシステムは以下の段階を行う。第1に、慢性的に感染された細胞（クローン化）をマイクロタイタープレートにまき、そして7日間増殖させる。次に、これらをメリチンにより、図に示す期間の最終日又はその途中迄のいずれかにて作用を受けさせる。生存細胞数をMTT、即ち代謝（デヒドロゲナーゼ）試験により定量する。このMTT試験は自動で行う。毒性作用は実験時に調べ、別のコントロール実験において調べたのではない。更に、最終洗浄より24時間から7日間の様々な経過期間由来のウイルス細胞を含む上清液をこの培養物から回収し、そして抗原又はウイルスの酵素の逆転写酵素（RT）を利用するウイルス定量のためのフリコートを保存した。更に、フリコートをマイクロタイタープレート中の非感染細胞の培養物に加え、これらの非感染細胞に伝染するこのウイルス細胞の能力をその後調べた。これに関連して、感染細胞の数をイムノペルオキシダーゼ染色法によって自動的に定量した。この試験結果は示した通り、メ

リチンの毒性（MTT試験）；初期培養物からのHIVの避離（RT試験）；及びもとは感染されていない細胞に感染する避離ウイルスの能力として表わした。

図6及び7を参照することにより最も分る通り、HIV感染細胞へのメリチンの全体的な作用は、感染細胞からのウイルス細胞の避離の障害であると考えられる（図6）、しかしその天然の型は感染細胞に選択的に作用しないようである（図7）。この関係はメリチン6（図8と9）、メリチン4（図10と11）、メリチンE（図12と13）、メリチンF（図14と15）、メリチン3（図16と17）及びメリチン1-20（図18と19）それぞれに関して示された。このデータから得られる情報は注目すべきであり、その理由はメリチンの膜への作用はメリチンのそのC末端を介しての細胞への表面結合に依存すると考えられるからである。初めに説明した通り、この結合特性はLys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-Aspのアミノ酸配列を含むC末端配列に基づく陽電荷に依存するとも考えられる。メリチンの作用が既知のチャンネル形成のメカニズムに基づくか、又は知られていないプロセスによるものかを調べるため、本発明者は(1-20)-6-(Gly)-Aspを試験した。この型のメリチンの電荷の欠如に基づき、これはその両親媒性特性と同じ方法において作用し、そして細胞表面との特異的な相互反応に依存しないものと考えられていた。しかしながらこの発明者の仮説に反して、図18及び19を参照することにより最もよく分る通り、細胞表面に特異的結合せず、

そしてそれ故より毒性の低いメリチン類似体は、ウイルス細胞遊離を阻害し且つHIV感染細胞を選択的に殺傷もすることがはっきり認められた。この実験データは、メリチンの毒性、細胞毒性効果が感染細胞の選択的な殺傷をおそらくマスクすることを示唆する傾向にあった。これはメリチンの溶解特性がその抗-HIV作用に含まれていない可能性を予測させる。従ってこれは新規であり、且つ今迄開示されていないメリチンの作用の態様である。

更に試験結果は天然のメリチンがHIV感染したC5細胞を溶解せしめることができることを明白に示す。例えばこの試験データは、この作用の性質がこの臨界濃度の現象に関連すると考えられることを示した。より詳しくは、この臨界濃度に達している場合(10 $\mu$ g/ml)、全ての細胞、即ち、非感染及び感染細胞は殺傷される。この作用はHIV遊離における作用よりも10倍高い濃度で生ずる。メリチンCOOHを試験し、そしてこれはメリチンアミドよりも効力が弱いことがわかった。以上の他、2種類のメリチン類似体を試験した。これらは位置21-26において陽電荷アミノ酸の結合性尾部が欠如していた。これら両者のメリチン類似体はHIV感染細胞に同一と判断される作用を有し、即ちこれらの感染細胞は選択的に殺傷された。例えば、10 $\mu$ g/mlにて、半数の感染細胞が殺傷され、そして非感染細胞は実質的に影響を受けなかった。更に、臨界濃度での細胞溶解に基づき、メリチンの毒性として説明されることが出来る細胞の溶解は、利用した濃度において観察されなかった。メリチン類似体の

作用は類似体の濃度の上昇により、感染細胞の生存率を定量的に低下させることを示した。このメリチン類似体の作用は簡単には説明できない。即ち、感染細胞は非感染細胞と同程度に明らかに生存しており、従ってもしHIV遊離が阻害される場合、それらは非感染細胞よりも速い速度で死滅することはないであろう。更に、両親媒性構造を介して作用する、抗ウイルス物質としてのメリチンの作用はメリチン(1-20)の作用により更に実証された(それぞれ図18及び19)。これに関して、メリチン1-20はその分子の細胞結合部が欠如していることを理解すべきである。しかしながら、この類似体はそれにもかかわらず天然のメリチン及びメリチン(1-20)-6-(GIY)-アミドと同様にHIV遊離を阻害した。更にこのメリチンは、陽電荷C末端を有さないメリチン、即ちメリチン(1-20)-6-(GIY)-アミドと同様に感染細胞の増殖を阻害した。従って、メリチンの抗ウイルス作用はメリチンの既知の細胞溶解メカニズムに依存せず、むしろメリチンの両親媒性及び膜カオトロピック作用に依存すると考えられる。従い、感染細胞の選択的殺傷はHIV遊離の阻害と相関する。これは現状では推測であるが、この作用はメリチンの現在迄分っていない作用に基づくであろう。

毒性マストバランの作用も図20及び21に示す。これは両親媒性ペプチドであるが、やや短めのものと考えられ、そして14個のアミノ酸残基のみを含む。従って、これはポリマー型においてのみ膜に分散することができる。類似の構造

を有すペプチド、即ちMHC(MAJOR組織適合性複合配列)及びGP41類似体、並びにマストバランは既に明らかである作用を有していないことに注目することが重要である。更に、メリチンと明らかに構造上類似していないコントロールペプチドも作用を有さなかった。

図30及び31をより詳しく参照すると、本発明者は、細胞内におけるウイルスタンパク質24の形成を測定することにより、メリチンにより処理された感染体(クローン培養物)においてこのウイルスタンパク質合成は全体的に低められることを発見した。このことは本質的に、該ウイルスにおけるメリチンの作用は、感染細胞から遊離する前のウイルスに攻撃することであり、しかも細胞培養物等へのメリチンの添加の最中又は直後にウイルスの数を低下せしめることが可能であることを意味する。しかしながら、この事実がウイルス生産がこの培養を開始から約3~5日かけて最大値に達することを示している。この時点において、メリチンは培養物には存在していない。更に、得られるこれらの試験はメリチンが19時間の半減期を有し、且つそれは培養物に添加して2時間を経過した後はこの増地中において測定できない、即ち、これは細胞に取り込まれていることを示す。この観察は「細胞遊離」ウイルス、即ち、上清液に放出されたウイルスにおけるメリチンの直接的な作用によって説明される実験結果を全てを排除する。

膜類毒素の繰り返し投与の作用をマウスにおいて調べた。10匹のNMR1マウス(それぞれの性を5匹づつ)のグル

ープに以下の毒素を皮下的に付与した。ハチミツ、スズメバチ、オオクマバチ混合物又はスズメバチ科の混合物を0、4、7、12、14及び16日目に与えた。各動物にそれぞれ1、2、5、5、10、25及び50 $\mu$ gの毒素を投与せしめた。その後、各動物は50 $\mu$ gの毒素の注射を毎月5ヶ月にわたり受けた。第5のグループにはコントロール溶液を与え、これをコントロールとした。このデータをそれぞれ図35から41Aにまとめた。臨床観察及び体重記録を繰り返し行った。この実験の終了時に、全ての動物を解剖し、そして組織学的検査を行った。この検査の結果より、マウスはこの4種の毒素に非常に耐性であることが考えられた。異常な成長又は顕微鏡的変化は見られなかった。

#### 長期毒性試験に用いた材料と方法

##### 種々の膜類毒素の利用

##### 序 論

哺乳類における膜類毒素の繰り返し投与の効果の評価するため、長期毒性試験をマウスにおいて行った。

##### 試験物質

以下の膜類毒素の種由来の毒素を試験した：

ハチミツバチ(アピスメリフェラ：Apis mellifera)(ref. Nr. BV02)、

スズメバチ(ベスブラマクリフロンス)(ref. Nr. YJ02)、

オオクマバチ混合物(白色類オオクマバチ(ベスブラマクリタ：vespula maculata)、及びスズメバ

チ(ベスブラアレナリア: *vespula arenaria*) (ref. nr. MH01)

スズメバチ科混合物(スズメバチ、白色頭オオクマバチ及びスズメバチ) (ref. No. MV02)。

コントロール動物は以下のコントロール溶液を受けた:

NaCl: 0.12M

ヒト血清アルブミン(HSA): 0.03%

マンニトール: 3%

リン酸ナトリウム: 0.005M

pH 7.4

#### 試薬の準備

これらの毒素を種々の濃度においてエバン(Evan)の緩衝食塩水、pH 7に、各投与時に同一の投与量、即ち、0.5ml/動物を確保するために希釈せしめた。

NaHPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O - 0.711g/L

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0.363g/L

NaCl - 5g/L

フェノール - 4g/L

ジ-Na-EDTA · 2H<sub>2</sub>O - 0.1g/L

#### 動物及び条件

動物: マウス、NMRI種、SPP (Anticimex, Norrviken)、生後7週間、体重(♀) 25g、(♂) 30g、5匹/ケージで飼育。

えさ: 任意量のペレット (Anticimex, R3) 及び水。

温度(周囲): 22±1℃。

湿度(相対): 50±10%。

光(人工): 12時間/日。

#### グループのサイズ

10匹づつの動物(各性5匹づつ)をランダムに選別して5つのグループに分けた(1組のコントロールグループを含む)。

グループ	マウスNo.	化合物
1	1-10	コントロール
2	101-110	ハチミツバチ
3	201-210	スズメバチ
4	301-310	オオクマバチ混合物
5	401-410	スズメバチ科混合物

#### 投与量

No. 2~5の各グループに、以下の投与スケジュールを利用した。

日	0	1	μg	毒素/動物
"	4	2.5	"	"
"	7	5	"	"
"	12	10	"	"
"	14	25	"	"
"	16	50	"	"

その後、各マウスは毎月50μgの毒素を5ヶ月間受けた。従ってこの実験期間中に各マウスの注射された毒素の量の合計は343.5μgであった。コントロール動物も同じタイ

ムスケジュールに従ったが、それらはグループ2及び3と同一のマンニトール及びHSAの相対濃度を含むエバンの緩衝食塩水に希釈せしめたコントロール溶液0.5ml/一匹を各時点にて受けた。

#### 投与のルート

背の中央の腰椎部に皮下的に投与。

#### 観察

不健康又は毒性の臨床徴候をコントロールし、そして毎日記録した。

#### 体重

個体の体重を投与開始前及び各投与の後に記録した。

#### 最終試験

50μg注射を開始してから6ヶ月後、全てのマウスを殺し、そして解剖した。組織学的調製品及び組織病理学検査のための組織を以下の器官から採取した: 皮膚、だ液腺、気管、肺及び気管支、心臓及び大動脈、甲状腺、副甲状腺、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、腸間膜のリンパ腺、肝臓、胆嚢、大腸筋、座骨神経、胸骨分節、胸腺、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精嚢、前立腺、精巣、卵巣、子宮、陰、下陰体、目、腎臓及び注射部。

#### 結果

検査の結果のそれぞれのデータを図35-41Aに示した。

#### 臨床徴候

マウス、309号(オオクマバチ混合物)はこの実験期間

の最後の2ヶ月間、連続的に円運動するようになった。

マウス、203号(スズメバチ)はこの実験の終了1ヶ月前の短い間、脱毛を伴った水腫状且つただれた前足を有した。

体重 図36-40を参照のこと。

体重は投与の影響を受けなかった。

#### 最終試験

##### 肉眼的病理学

脾臓はマウス304号(オオクマバチ混合物)において腹壁に、そしてマウス406号(スズメバチ科混合物)において脾臓に固く付着していた。マウス101号及び105号(ハチミツバチ)はそれぞれ固い、1mmの小塊をその肺に有していた。その他の顕著な肉眼的発見はできなかった。注射部位は膨潤又はその他の変化を伴うことなく、殺傷時のままであった。

##### 顕微鏡的病理学

顕微鏡検査の結果を図41及び41Aに示した。腸間膜のリンパ腺における反応性壊死が以下のマウスに見られた: 110号(ハチミツバチ)、307号及び308号(オオクマバチ混合物)、406及び410号(スズメバチ科混合物)。マウス210号(スズメバチ)において、その腸間膜リンパ腺に中程度のリンパ腺過形成が生じていた。

マウス310号(オオクマバチ混合物)において、その脾臓に至急性又は慢性細胞反応を伴う病巣壊死があった。マウス304号(オオクマバチ混合物)において、脾臓から腹壁にかけての付着は慢性的な繊維形成によるものであり、そし

マウス406号(スズメバチ科混合物)における脾臓から脾臓にかけての付着は慢性炎症形成によるものであり且つよく血管化(vascularized)されていることが見い出された。

腸間膜リンパ及び脾臓における上記の変化は脾臓系により引き起こされたものでありうるが、しかしそれらは動物の脾臓状態に<sup>1</sup>関係なく無容な特徴であると判断される。

脾において小さな脾臓が、マウス101号及び105号(ハチミツバチ)並びにマウス402号(スズメバチ混合物)において見られた。マウス407号(スズメバチ混合物)において、小さな結節性血管支上皮過形成が見られた。これらのタイプの変化は自発的に生じる。

コントロールマウス及びこれらの脾臓の付与されたマウスにおいて、わずかな細胞浸潤物を有す肝実質細胞(hepatic parenchymal cells)の小さな坏死がしばしば見られた。又、若干の慢性炎症変化が3匹のコントロールマウスにおける脾臓に見られた。

#### ローシャー(Rauscher)白血病マウスにおける体内内芽腫

ローシャー白血病マウスは一般に認められている哺乳類のレトロウイルス感染症のモデルである。このウイルスはマウスに赤血球生成白血球を生じさせ、これは赤血球の生成の増大の指標としての脾臓のサイズの増大により示される。脾臓のサイズは感染動物の死を直接的にもたらす疾患の進行の測定として取られる。6週間のC17の尾端を有すメリチン類似

体の作用をこのシステムにおいて試験した。

メリチンの抗ウイルス作用の原型の試験をBab Cマウスで行った(生後12週間;金て組)。この動物をケージ当たり4匹で飼育した。ローシャー白血球ウイルスによって、腹腔内注射によりこれらの動物を感染せしめ(一匹当り、0.2mlの容量において $10^5$  個感染性粒子(ウイルス))、その10分後に試験物質を皮下注射せしめた。これらの動物はコントロール(食塩水の類似注射を受けたもの)又は試験動物(メリチン類似体を受けたもの)として2つのグループに分けた。

上記の通りに感染せしめたバルブCマウスそれぞれ16匹の2つのグループに、リン酸緩衝食塩水(2.5mMのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、150mMのNaCl、pH7.8;PBSと称す)又はメリチン-6-gly(0.1mlの容量において、5 $\mu$ g/体積 $\mu$ g)のいずれかを注射した。このペプチドは100 $\mu$ g/mlとして溶解せしめ、そしてコントロール及び試験動物のそれぞれは皮下的に同容量(0.1ml)のPBS又はPBS+試験物質を注射された。この注射は、感染性ウイルスの注射の10分後に行った。2日後、これらの動物は断たなるメリチン類似体(10 $\mu$ g/体積 $\mu$ g)又はPBSの注射を、0.100mlの皮下注射として受けた。最初の注射から4日後、20 $\mu$ g/体積 $\mu$ gのメリチン類似体を用いて第3回目の注射を行った。全ての動物はメリチン類似体又はPBSの注射によって影響を受けることはなく、そして注射の後の期間生存し続けた。

#### 考 察

全体的な印象は、マウスは第4組のひ系、即ち、ハチミツバチ、スズメバチ、オオクマバチ混合物及びスズメバチ科混合物を少量の投与量生法において投与された場合にそれらに耐性であったことである。異常な肉眼的又は顕微鏡的变化は見い出せなかった。

初めに説明した通り、メリチンは哺乳類におけるHIV感染症の治療を、おそらく主要HIVタンパク質の1つ、即ち、Gタンパク質GP41との相互作用によって提供すると考えられる。このことは、GP41のトランスメンブラン領域とメリチンとの間の類似性により考えられ、そしてこのことは図5を参照することによって最もよくわかる。

図5において示す通り、GP41は分子の膜結合部の固有な特徴でありうる両親媒性部位を有する。GP41の両親媒性部位は荷電アミノ酸の交差ループを形成し、ここでこのループの二本の部位はメリチンの口合体に適合する相違と類似する電荷中和部位を形成せしめる。メリチンはGP41による分子内電荷中和の正常なる形成も妨げ、これによってGP41の相違を大きく度化せしめる。このことはウイルスの形成に影響を及ぼし、その理由はウイルスの形成は普遍的なウイルス発生プロセスを行えるようにするGP41とウイルスタンパク質P17の位との相互作用に依存すると考えられるからである。ウイルス、例えばHIVは、ウイルスゲノムを含む細胞膜上の小さな膜芽(membrane bud)の形成を含むプロセスにより細胞から細胞へと広がるものと理

通常、感染マウスは2週間以内に150mg以上の量の脾臓を生じせしめる。このサイズは2.5g迄大きくなることが出来る。正常な脾臓は小さくて0.1mg、大きくて0.15mgであり、95%のマウスがこの範囲内の脾臓を有す。2週間後に170g以上の脾臓を明らかに感染症として検出し、正常値の上限値150mgと170mgの間の脾臓をボーダーラインのケースとした。2週間後、コントロールグループにおいて試験した全ての動物は150mgより大きい脾臓を示した。試験した動物のテストグループの25%においても150mg以上であるが170mg以下の脾臓を示し、そしてこれらはボーダーラインケースとして与えられる。しかしながら、残りは脾臓の増大の徴候を示さず、即ち、それは正常な動物としての100~150mg内であった。1匹の動物のみがコントロールグループにおける100%と比較して病理的であった。

以下の各々が上記の試験から導かれる。

1. 動物は、本特許明細書に詳細のインビトロ試験と匹敵する環境におけるメリチン類似体による処置に生存し続ける。
2. 第メリチン類似体は、哺乳類におけるレトロウイルスの発生を阻害する。なぜなら、比較処置したコントロールグループにおいて疾患は100%発症したのと比べ、感染動物の75%は疾患を発症せしめなかったからである。
3. HIVのみでなく、その他のレトロウイルスもメリチン及びその類似体により阻害される。

解されている。このプロセスは細胞膜の变化に感受性であると考えられる。例えば、脂質成分の添加は感染細胞からのウイルスの遊離を防げることがよく知られている。この作用はおそらく細胞膜上のカオトロピック作用に基づく。しかしながら、この作用のメカニズムは未だ明確でない。

メリチンの相互作用を可能にするGP41の相違的な特徴はアミノ酸770～856の間にあると考えられ、そしてここには770～794及び824～856の両親媒性配列が含まれる。図5を参照のこと。これらの配列の両親媒性は、低い全体的な親水性と、組合さったそれらの高い親水性部位により放出される。この二本の両親媒性部位は分子力学によってモデル化され、そしてそれらはその両親媒性に基いて相互作用することができ、これによってそれらはトランスメンブランループを形成することによって膜の中に侵入することが潜在的に可能となる。他方、それらは細胞膜の内部膜上に押していることもできる。どのケースにおいても、メリチンとの相互作用はGP41の細胞膜部分の部位の位置を変化せしめ、これによってウイルス形成の不安な先駆体と考えられるp17との相互作用を防げる。これに因って、メリチン及びGP41の両親媒性配列824～856の間の間隔ある類似性は、それらが共にその両親媒性ヘリックスにおいてプロリンを有することにある。この相違的な特徴は初めて説明した通り、このヘリックスに120°のねじれを導入せしめ、従ってそれらがわずかに折り曲った形を有することを引き起こさせる。他方、メリチンは膜と相互作用することが

でき、これによってカオトロピック剤として働く。このことも、その両親媒性的性質によるであろう。カオトロピック剤の作用は膜に並んでいるリン脂質の配列の乱れを引き起こすことにあると考えられる。このような作用は膜の相転移期における変化及びその後のそれらの取り込みの変化を引き起こす。期待された通りの、メリチンの浮化がカオトロピック効果を引き起こすことはよくあることではない。しかしながら、この現象がどのようにしてウイルスの感染プロセスに作用するかは不明瞭であり、そして現在定まっていない。しかしながら、大いなる抗HIV作用の感度又は変化が膜の脂質配列の並びにおいて生じた。更に、種々のリン脂質成分の添加も感染細胞からのHIVの遊離を防いだ。しかしながらこの作用を引き起こす脂質分子を同定することはできていない。

ところでメリチンはリン脂質と相互作用することが知られ、そしてこの未解明脂質分子のこの作用又はその結合はHIV感染に関与するとも考えられ、これもメリチンの抗作用の説明を提供するであろう。おそらくこの脂質はリン脂質ではなく、その理由はリン脂質の添加はメリチンと非常に類似する作用を有するからである。

浮化において、これらの試験結果はメリチンが二つの作用を有することを示唆する。即ち、メリチンはウイルスを不活性化せしめる短い第一期及び少なくともP24の生産を低める長い第二期を有すると考えられる。これらの特徴はメリチン両親媒性ヘリックスの特異的な相違に起因するであろう。更に、この試験の前提は、尾節相違が類似体の有効性を決定す

るがその作用の性質は決定しないことを示唆する。即ち、 $\text{Lys-Arg-Lys-Arg-Gly-Gly}$ を先導に含む尾節を有する類似体の有効性は尾節部を有さないメリチンの有効性の約100分の1である。上記の他、この試験結果は上液の感染性が感染細胞でのメリチンによる単独処理によって引き下げられることを示唆した。これに関して、この処理は培養を開始することであり、そして感染性の測定は処理の7日後である。前記した通り、この型の培養物における最大ウイルス収量は培養の5日後迄到達されなかった。本発明者が上記より早くことができることは、処理7日後の低められているウイルス感染性がウイルスにおけるメリチンの直接的な作用にのみ基づくならば、メリチン又は毒性フラグメントの効力が処理の5日後のような速さで現れていることと認められるであろう。この可能性はなく、その理由は本発明者はメリチンが培養の開始後数時間以内に細胞によって吸収されることを発見したからである。更に、上液の感染性の低下が、ウイルスの不適切な形成又は新たに合成されるビリオンの阻害と対立して、低められたウイルス生産に部分的に基づくなら、このような現象においてこれは細胞内及び/又はメリチン処理培養物の上液中における低められたウイルスタンパク質の量に反映されるべきである。この仮説が正しいかを調べるため、本発明者はウイルスのタンパク質生産に関するマーカーとしてP24マーカーを選んだ。この試験データは、メリチンとの3時間のインキュベーションにより、細胞及び上液のP24のあるにしてもほんのわずか

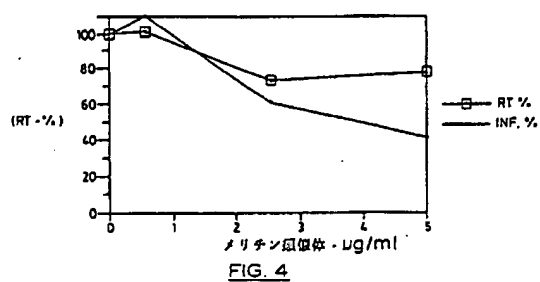
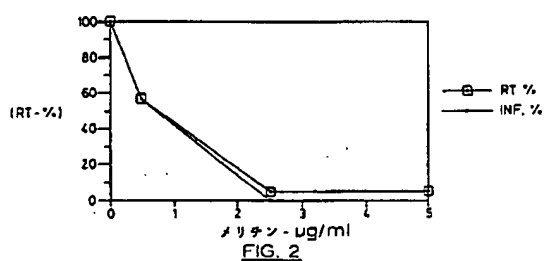
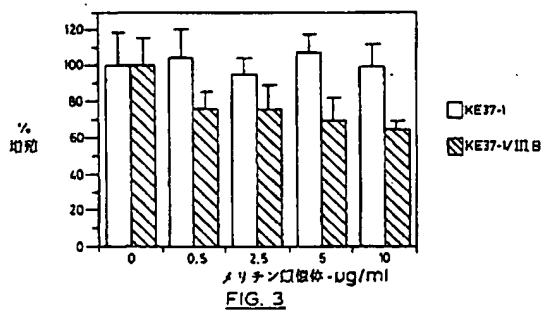
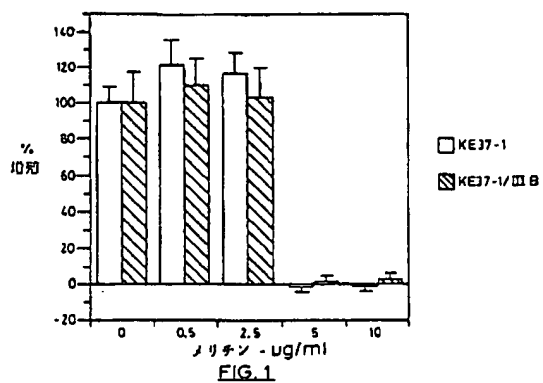
な低下のみを示した。しかしながら、メリチンとの14時間のインキュベーションによっては、細胞及び上液におけるP24のめざましい低下が得られた(60%程度の低下)。そして、細胞P24は上液P24よりも早く且つより強く引き下げられると考えられる。更に、メリチンとの無細胞HIVのインキュベーションはP24抗原の検出を弱めることはなかった。これはウイルスの感染性を引き下げること引き起こすのみであると考えられる。

マウスにおけるインビトロ実験も実施した。

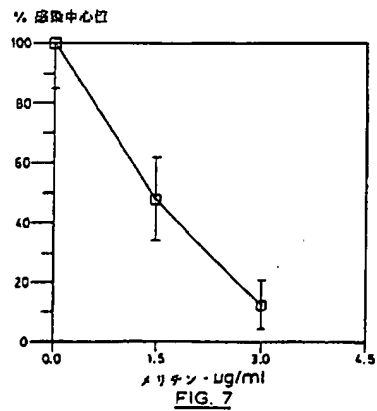
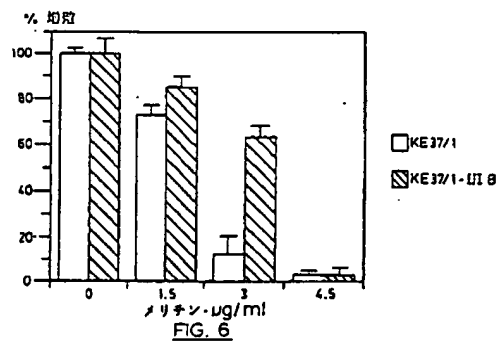
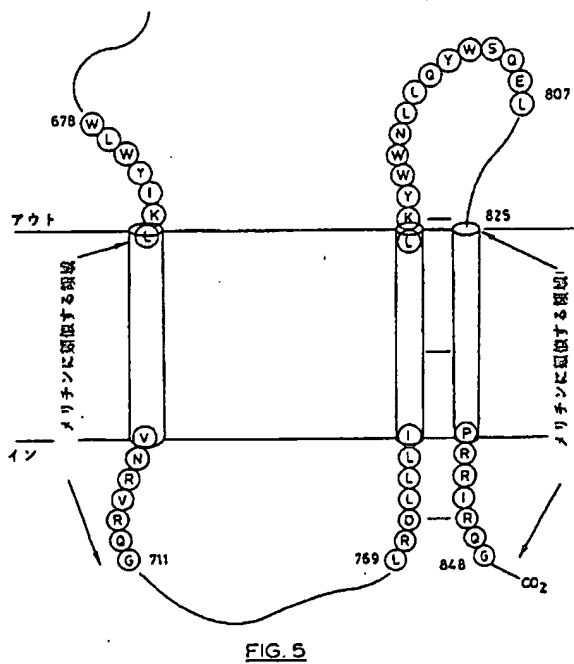
以下のデータが上記の実験から得られる。

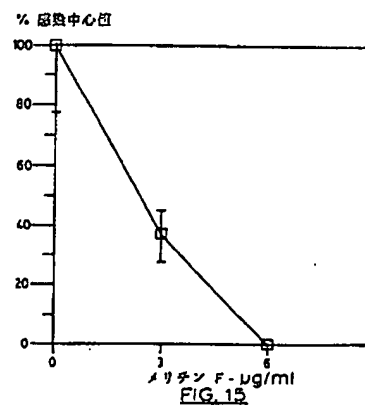
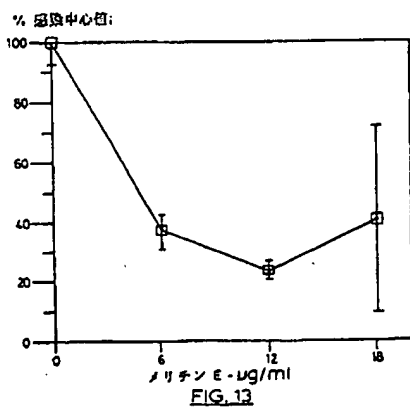
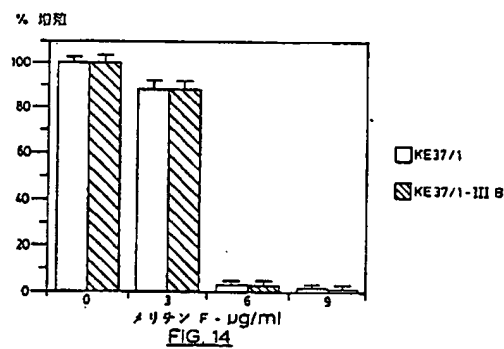
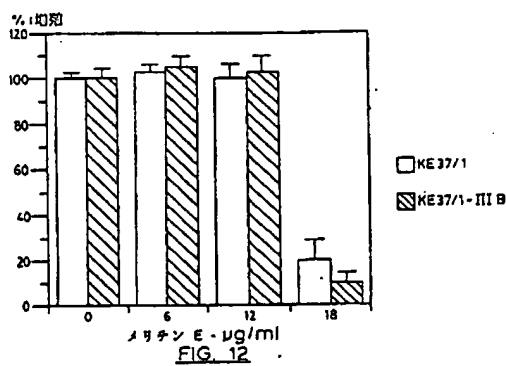
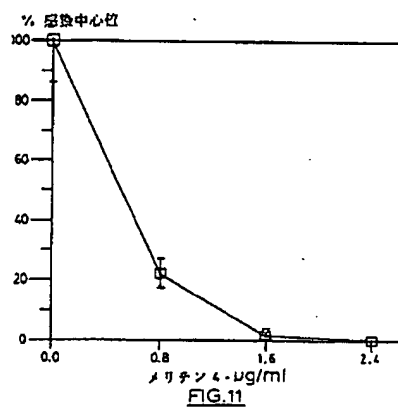
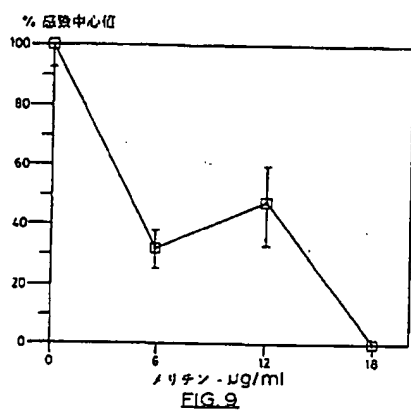
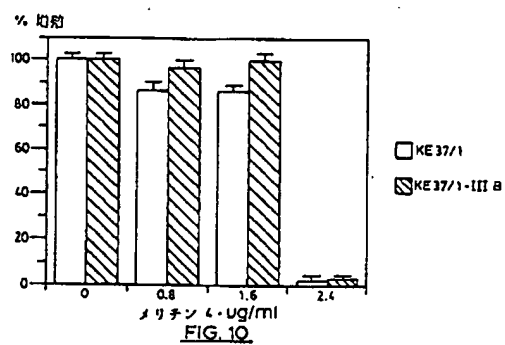
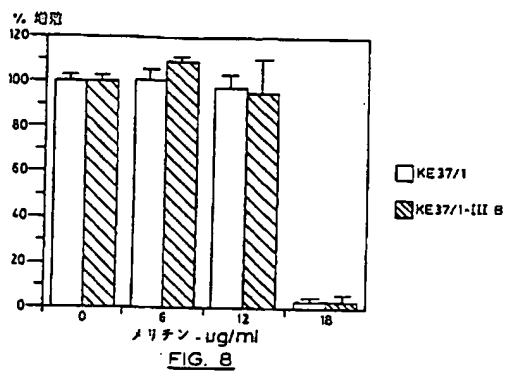
1. 動物は、本特許明細書に詳細のインビトロ実験と対比する程度におけるメリチン類似体による処置に生存し続ける。
2. 該メリチン類似体は、口乳嚢におけるレトロウイルスの発育を阻害する。なぜなら、比較処置したコントロールグループにおいて疾患は100%発症したのと比べ、感染動物の75%は疾患を発症せしめなかったからである。
3. HIVのみでなく、その他のレトロウイルスもメリチン及びその類似体により阻害される。

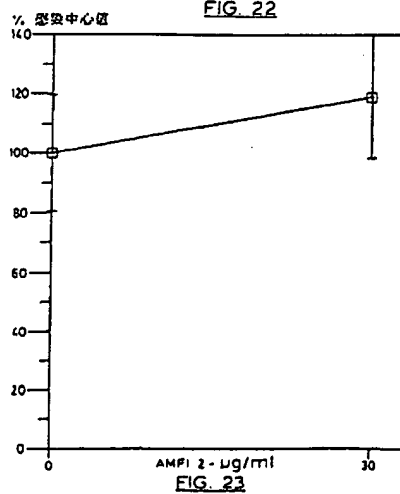
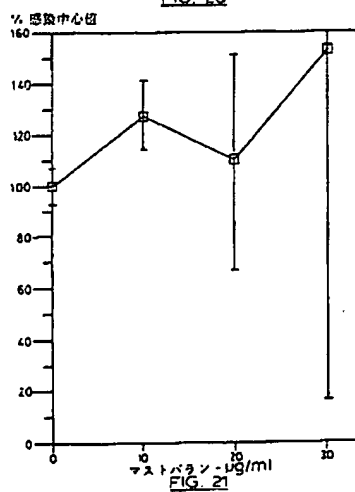
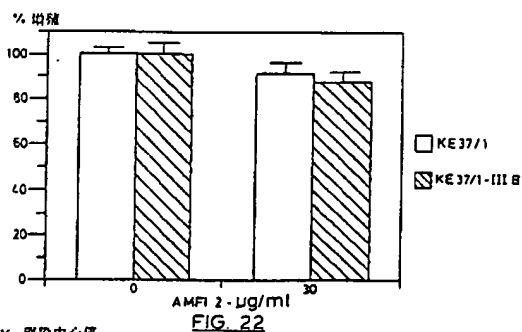
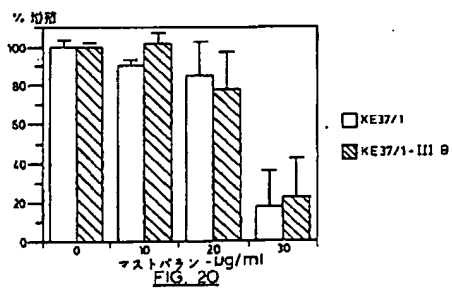
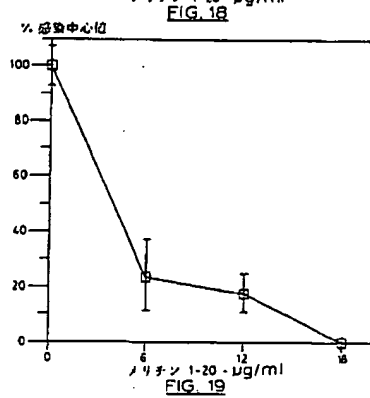
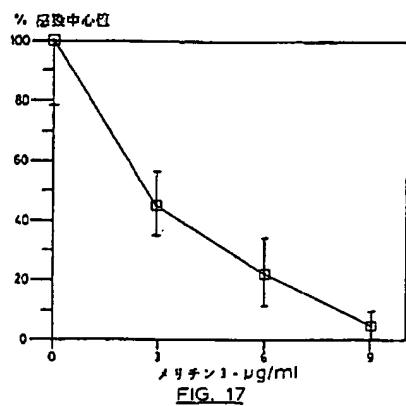
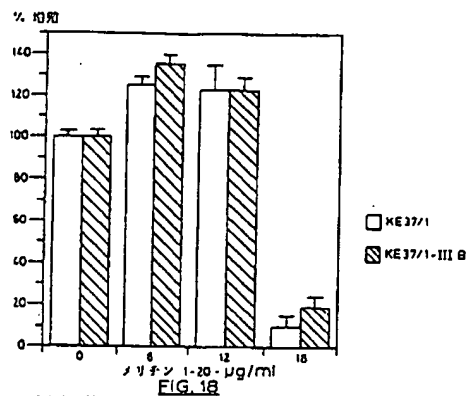
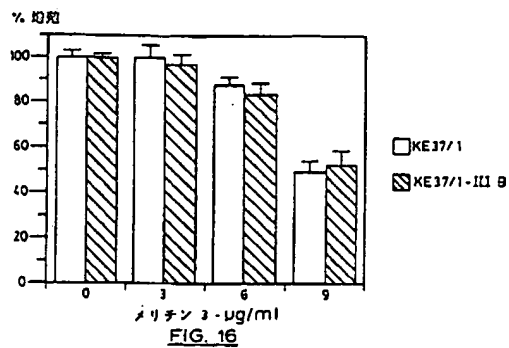
本発明を最も実用的且つ好ましい態様において詳細してきたが、これらの改良を本発明の範囲を逸脱することなくなされるべきである。



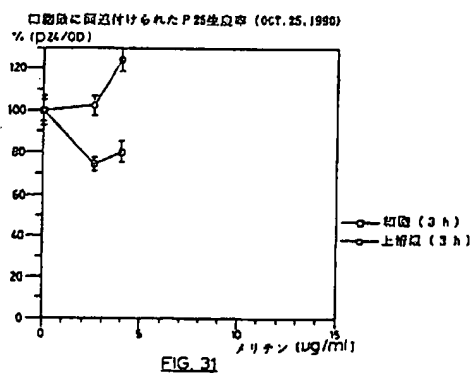
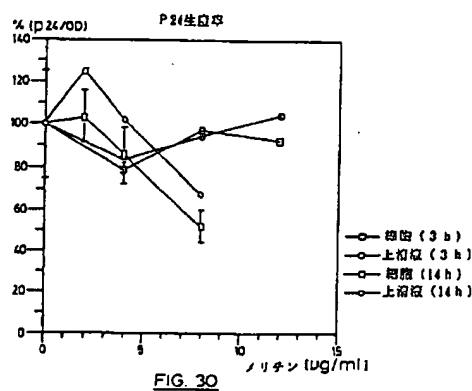
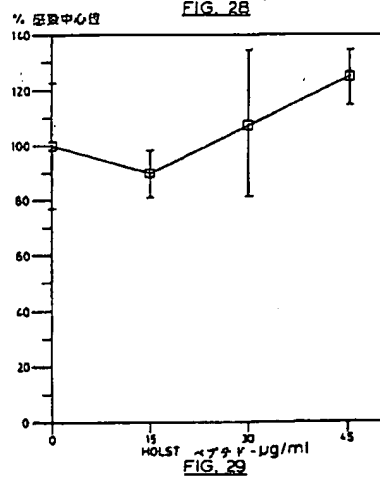
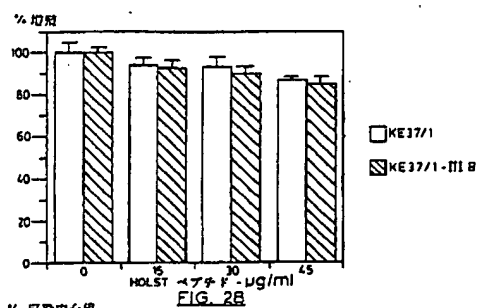
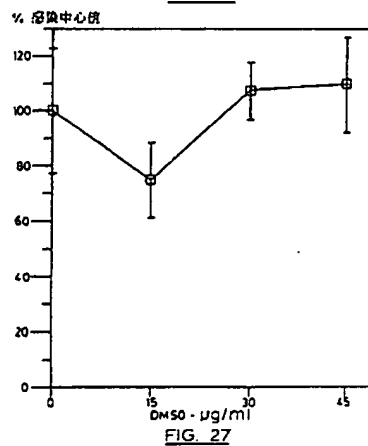
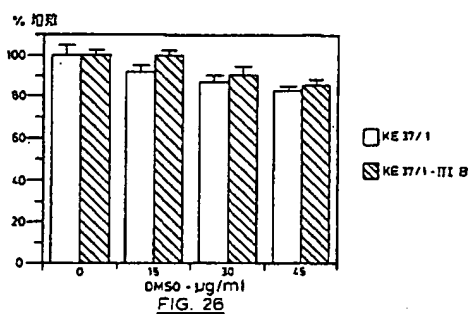
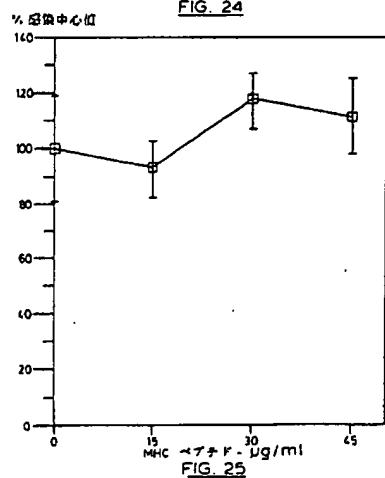
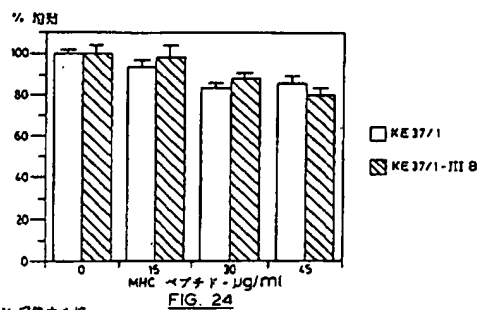
GP41のカルボキシ末端領域のモデル











メリチンとの3h及び14hのインキュベーション後の細胞及び上清液中のP24

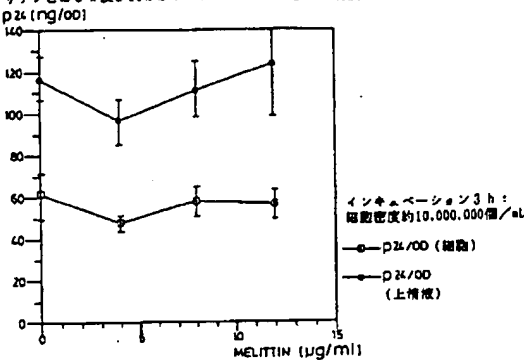


FIG. 32

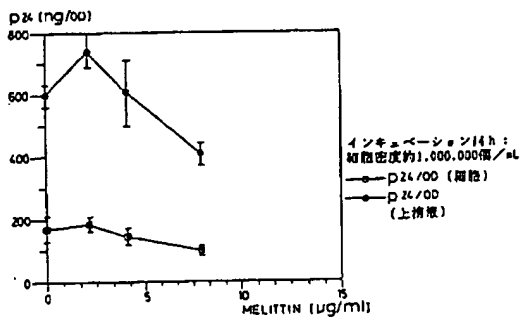


FIG. 33

細胞内HIV含有上清液におけるP24測定へのメリチンの影響

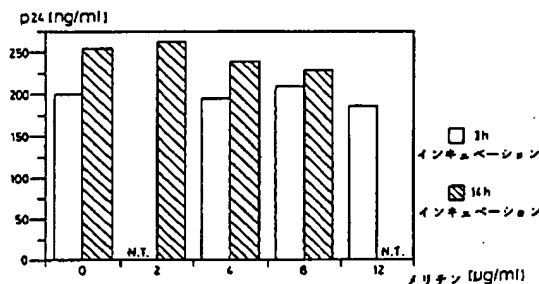


FIG. 34

FIG. 35

調製細胞系、米国特許試験-マウス  
体重グラム (g)  
グループ平均データ

グループ	0	4	7	12	14	16	47	77	300	330	372	400	2000-2008
コントロール	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4
ハチミツバチ	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4
スズメバチ	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4
ハチミツバチ	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4
スズメバチ	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4

FIG. 36

調製細胞系、米国特許試験-マウス  
体重グラム (g)  
グループ平均データ

グループ	0	4	7	12	14	16	47	77	300	330	372	400	2000-2008
コントロール	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4
ハチミツバチ	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4
スズメバチ	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4
ハチミツバチ	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4
スズメバチ	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4

FIG. 37

試験用毒系、鼠用毒性試験-マウス  
体重グラム(g)  
グループ平均データ

マウス No.	性別	投与開始後の各日での体重(g)												(原例)
		0	4	7	12	14	16	47	77	109	138	172	200-4	
101	ハチミツバチ	0	29	29	29	30	30	31	31	31	34	34	35	
102	"	0	31	31	31	31	31	32	32	34	40	43	37	
103	"	0	31	31	31	32	32	32	33	34	35	32	34	
104	"	0	30	30	31	31	31	30	32	32	33	35	34	
105	"	0	20	20	21	22	22	22	23	24	25	26	28	
106	"	0	24	23	24	24	25	25	26	26	26	26	28	
107	"	0	24	24	24	25	26	25	27	28	28	30	30	
108	"	0	24	23	25	25	24	24	27	26	27	27	28	
109	"	0	26	27	26	27	27	26	30	31	31	31	32	
110	"	0	24	24	25	24	25	26	26	28	28	30	34	

FIG. 38

FIG. 38

試験用毒系、鼠用毒性試験-マウス  
体重グラム(g)  
グループ平均データ

マウス No.	性別	投与開始後の各日での体重(g)												(原例)
		0	4	7	12	14	16	47	77	109	138	172	200-4	
201	スズメバチ	0	34	34	35	35	36	35	38	39	40	40	37	
202	"	0	30	30	30	30	31	31	33	35	35	36	35	
203	"	0	32	32	32	32	33	33	33	33	35	37	39	
204	"	0	31	31	32	32	32	33	35	35	34	37	38	
205	"	0	30	29	30	30	30	29	31	31	34	34	34	
206	"	0	33	33	33	34	34	34	36	36	36	38	37	
207	"	0	34	34	35	35	35	35	37	39	39	39	32	
208	"	0	23	24	24	24	24	25	27	29	30	32	30	
209	"	0	25	25	25	25	26	26	27	29	29	28	28	
210	"	0	24	23	25	24	24	26	28	30	30	31	30	

FIG. 39

FIG. 39

試験用毒系、鼠用毒性試験-マウス  
体重グラム(g)  
グループ平均データ

マウス No.	性別	投与開始後の各日での体重(g)												(原例)
		0	4	7	12	14	16	47	77	109	138	172	200-4	
301	4474付置合剤	0	34	35	35	35	36	36	39	42	49	58	40	
302	"	0	30	31	31	32	32	34	34	35	36	36	34	
303	"	0	34	34	35	35	36	36	36	36	36	37	39	
304	"	0	32	32	32	33	34	34	36	38	43	40	39	
305	"	0	36	36	36	37	36	37	40	42	38	37	40	
306	"	0	25	25	25	25	26	26	28	28	28	28	24	
307	"	0	25	25	25	26	26	27	26	26	25	24	29	
308	"	0	26	26	26	27	26	26	28	28	31	31	34	
309	"	0	25	24	24	24	25	27	26	28	28	29	28	
310	"	0	24	24	24	24	27	27	28	28	30	30	32	

FIG. 40

FIG. 40

試験用毒系、鼠用毒性試験-マウス  
体重グラム(g)  
グループ平均データ

マウス No.	性別	投与開始後の各日での体重(g)												(原例)
		0	4	7	12	14	16	47	77	109	138	172	200-4	
401	2574付置合剤	0	29	29	29	29	30	31	32	35	36	36	35	
402	"	0	27	27	28	28	28	30	31	32	33	33	32	
403	"	0	30	31	31	31	31	34	36	37	37	37	34	
404	"	0	30	31	31	31	31	33	35	37	37	38	38	
405	"	0	31	32	32	32	33	34	35	35	34	34	35	
406	"	0	24	24	24	24	27	28	28	30	32	31	29	
407	"	0	25	25	24	24	26	27	29	30	29	30	30	
408	"	0	23	24	24	25	25	25	27	31	33	33	28	
409	"	0	25	25	25	27	26	26	28	29	31	31	31	
410	"	0	24	24	24	26	27	26	28	30	30	30	31	

FIG. 41

FIG. 41(その1)

肺結核毒素、長期毒性試験-マウス。  
顕微鏡観察

マウス No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
性	→									
処 置	コントロール									
皮膚	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
心臓	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
肺	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
気管支	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
心臓及び大動脈	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
甲状腺	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
副甲状腺	-	0	-	-	-	-	-	-	-	0
食道	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
胃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
十二指腸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
空腸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
回腸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
盲腸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
小腸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
大腸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
肝臓	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
脾臓	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
腎臓	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
膵臓	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
胸腺	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
副腎	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
膀胱	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
子宮	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
卵巣	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
下体	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
目	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
注射部位	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

FIG. 41(その2)

マウス No.	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
性	→									
処 置	ハチミツバチ									
皮膚	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
心臓	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
肺	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
気管支	2	1	0	0	2	1	0	0	0	0
心臓及び大動脈	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
甲状腺	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
副甲状腺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
食道	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
胃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
十二指腸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
空腸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
回腸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
盲腸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
小腸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
大腸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
肝臓	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
脾臓	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
腎臓	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
膵臓	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
胸腺	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
副腎	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
膀胱	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
子宮	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
卵巣	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
下体	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
目	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
注射部位	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

FIG. 41(その3)

マウス No.	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
性	→									
処 置	スズメバチ									
皮膚	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
心臓	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
肺	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
気管支	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
心臓及び大動脈	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
甲状腺	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
副甲状腺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
食道	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
胃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
十二指腸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
空腸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
回腸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
盲腸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
小腸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
大腸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
肝臓	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
脾臓	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
腎臓	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
膵臓	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
胸腺	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
副腎	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
膀胱	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
子宮	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
卵巣	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
下体	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
目	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
注射部位	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

組織学的に正常な写真を有する臓器を0で示した。正常からかけ離れている場合、次項においてそれを説明する。「-」で示した臓器は組織学的に検定していない。

FIG. 41A

肺結核毒素、長期毒性試験-マウス。

Fig. 41. の解説

1. リンパ球細胞の病巣的な小さい増殖。
2. おそらく気管支上皮に由来する小さな腫瘍。
3. 気管支上皮の小さな結節形成。
4. 多核性顆粒球の浸潤を伴った小さく、古めかしい、そして見分けのつけられない壊死。
5. 多量の多形核の浸潤を有する病巣的な古めかしい壊死。
6. 多核性顆粒球の浸潤を伴う広範囲且つ不明瞭な壊死。
7. 中程度のリンパ系過形成。
8. わずかな細胞浸潤を有する数個の肝臓の壊死。
9. 繊維組織により若干仕切られ、そして多形核及びマクロファージが多量に浸潤されている、病巣的な壊死。
10. 若干の慢性腎盂腎炎。
11. 腹腔への慢性繊維性付着。
12. 脾臓への慢性繊維性付着及びよく血管化された付着。

## 利用したメリチン類似体及びその他のペプチド

1. Mollitia:  
Sequence: Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-Amide.
2. Mollitia 6:  
Sequence: Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-Amide.
3. Mollitia 6:  
Sequence: Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Lys-Lys-Lys-Gln-Gln-Amide.
4. Mollitia 4:  
Sequence: Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gly-Gly-Amide.
5. Mollitia 5:  
Sequence: Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Amide.
6. Mollitia 7:  
Sequence: Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Ile-Ser-Trp-Ile-Orn-Orn-Amide.
7. Mollitia 1-20:  
Sequence: Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Ile-Ser-Trp-Ile-Amide.
8. Amfi 1:  
Sequence: Gly-Thr-Asp-Arg-Val-Ile-Glu-Val-Val-Gln-Gly-Ala-Cys-Arg-Ala-Ile-Arg-His-Ile-Pro-Arg-Arg-Ile-Arg-Gln-Gly-Amide.
9. Amfi 2:  
Sequence: Gly-Gln-Arg-Val-Arg-Asn-Val-Ile-Ser-Leu-Val-Ala-Phe-Val-Ile-Arg-Leu-Gly-Val-Leu-Gly-Gly-Val-Ile-Met-Ile-Phe-Amide.
10. HMC:  
Sequence: Val-Ala-Ala-Lys-Ala-Asn-Arg-Val-Ala-Asp-Glu-Ile-Arg-His-Lys-Arg-Glu-Lys-Leu-Glu-Amide.
11. Molot:  
Sequence: Phe-Ala-Glu-Ser-Gly-Val-Asp-Thr-Pro-Val-Phe-Asn-Ser-Tyr-Amide.

哺乳類のHIV感染細胞の増殖又は感染細胞におけるウイルスの複製を阻害する、哺乳類に低毒性有効投与量のメリチンを投与することを含む哺乳類HIV感染症の治療のための方法及び組成物について開示する。

修正の図文提出  
(特許法第184条の8)

平成4年6月5日

特許庁長官 横 沢 亘 殿

- 1 特許出願の表示  
PCT/EP90/02127
- 2 発明の名称  
哺乳類のHIV感染症の治療のための方法及び組成物
- 3 特許出願人  
住 所 ドイツ連邦共和国、デー-8042 ノイヘルベルク、  
インゴルシュテッター ラントシュトラッセ 1  
名 称 ゲーエスエフ・ファルシエンクスツェントルム  
フュア ウムベルト・ウント・ガズント・ハイト、  
ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル  
ハフツング
- 4 代理人  
住 所 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号虎ノ門ビル  
〒105 電話 (3504) 0721  
氏 名 井根士 (6578) 岡 本 朗  
(外3名)
- 5 修正の提出年月日  
1992年2月10日
- 6 添付図面の目録  
修正の図文

## 明 細 書

又、この発明は、メリチン類似体であって、少なくともその最後の6個のアミノ酸(C-末端)が変異して6個のグリシン残基に置き代わられているものの直接的な作用が、メリチンに類似する治験的利点を有することを発見している。このアミノ酸類似体は、Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly の構造を有す。

Merck Index (1983) 第10版、5643号にメリチンが抗-リウマチ剤として利用できることが既に知られる。

米国特許出願第 3,856,936号は、ココアバター脂肪体との混合物における、有効量の全ハチマシ及びメリチンより成る群から選ばれるものより成る、局所的利用による哺乳類におけるコレステロールレベルコントロールのための組成物を開示している。

従って、感染細胞又はそのタンパク質性もしくはホリペプチ成分、あるいはメリチンの複製の阻害用途が既に知られている。しかしながら、HIV感染症の治療のための医薬品の製造におけるメリチン又は感染細胞の利用に関して述べている既知論文はない。

請求の範囲

1. 哺乳類のHIV感染細胞におけるウイルス複製を低める又は阻害せしめる哺乳類におけるHIV感染症の治療のための医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチンの利用。

2. 請求項1に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチンの構造類似体の利用。

3. 請求項1に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチン及びその構造類似体のポリペプチド混合物の利用。

4. 請求項1に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、少なくとも1種類の膜翅類毒素、少なくとも1種類の膜翅類毒素の活性タンパク質成分、少なくとも1種類の膜翅類毒素のポリペプチド成分、及びその混合物より成る群から選ばれる薬剤の利用。

5. 請求項1に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、ハチミツ毒素、マルハナ毒素、スズメバチ毒素、ボードフェースオオクマバチ毒素、該毒素の活性タンパク質成分、該毒素の活性タンパク質成分、及びそれらの混合物より実質的に成る群から選ばれる薬剤の利用。

6. 請求項1に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、連結している細胞結合性配列を有する又は有さない両親媒性 $\alpha$ ヘリックスの利用。

7. 請求項1に記載の医薬品の製造における、低毒性有効

投与量の、ハチミツ毒素、マルハナ毒素、スズメバチ毒素、ボードフェースオオクマバチ毒素、該毒素の活性タンパク質成分、該毒素の活性タンパク質成分、及びそれらの混合物より実質的に成る群から選ばれる薬剤の利用。

16. 請求項9に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、連結している細胞結合性配列を有する又は有さない両親媒性 $\alpha$ ヘリックスの利用。

17. 請求項9に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のGly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyの利用。

18. 請求項9に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチン及びGly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyの構造類似体の利用。

19. 哺乳類のレトロウイルス感染細胞におけるウイルス複製を低める又は阻害せしめる哺乳類におけるレトロウイルス感染症の治療のための医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチンの利用。

20. 請求項19に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチンの構造類似体の利用。

21. 請求項19に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチン及びその構造類似体のポリペプチド混合物の利用。

22. 請求項19に記載の医薬品の製造における、低毒性

投与量のGly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyの利用。

8. 請求項1に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチン及びGly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyの構造類似体の利用。

9. 哺乳類におけるHIV感染細胞の増殖を低める又は阻害せしめる哺乳類におけるHIV感染症の治療のための医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチンの利用。

10. 請求項9に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチンの構造類似体の利用。

11. 請求項9に記載の医薬品の製造における、Amf11及びメリチン様であるGP41のペプチドの利用。

12. 請求項9に記載の医薬品の製造における、Amf12及びメリチン様であるGP41のペプチドの利用。

13. 請求項9に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチン及びその構造類似体のポリペプチド混合物の利用。

14. 請求項9に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、少なくとも1種類の膜翅類毒素、少なくとも1種類の膜翅類毒素の活性タンパク質成分、少なくとも1種類の膜翅類毒素のポリペプチド成分、及びその混合物より成る群から選ばれる薬剤の利用。

15. 請求項9に記載の医薬品の製造における、低毒性有

効投与量の、少なくとも1種類の膜翅類毒素、少なくとも1種類の膜翅類毒素の活性タンパク質成分、少なくとも1種類の膜翅類毒素のポリペプチド成分、及びその混合物より成る群から選ばれる薬剤の利用。

23. 請求項19に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、ハチミツ毒素、マルハナ毒素、スズメバチ毒素、ボードフェースオオクマバチ毒素、該毒素の活性タンパク質成分、該毒素の活性タンパク質成分、及びそれらの混合物より実質的に成る群から選ばれる薬剤の利用。

24. 請求項19に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、連結している細胞結合性配列を有する又は有さない両親媒性 $\alpha$ ヘリックスの利用。

25. 請求項19に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のGly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyの利用。

26. 請求項19に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチン及びGly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyの構造類似体の利用。

27. 哺乳類におけるレトロウイルス感染細胞の増殖を低める又は阻害せしめる哺乳類におけるレトロウイルス感染症の治療のための医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチンの利用。

28. 請求項27に記載の医薬品の製造における、低毒性

有効投与量のメリチンの構造類似体の利用。

29. 請求項27に記載の医薬品の製造における、Amf11及びメリチン様であるGP41のペプチドの利用。

30. 請求項27に記載の医薬品の製造における、Amf12及びメリチン様であるGP41のペプチドの利用。

31. 請求項27に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチン及びその構造類似体のポリペプチド混合物の利用。

32. 請求項27に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、少なくとも1種類の膜細胞毒素、少なくとも1種類の膜細胞毒素の活性タンパク質成分、少なくとも1種類の膜細胞毒素のポリペプチド成分、及びその混合物より成る群から選ばれる薬剤の利用。

33. 請求項27に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、ハチミツ毒素、マルハナ毒素、スズメバチ毒素、ボールドフェースオオクマバチ毒素、該毒素の活性タンパク質成分、該毒素の活性タンパク質成分、及びそれらの混合物より実質的に成る群から選ばれる薬剤の利用。

34. 請求項27に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、連結している細胞結合性配列を有する又は有さない両親媒性 $\alpha$ ヘリックスの利用。

35. 請求項27に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のGly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyの利用。

36. 請求項27に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチン及びGly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyの構造類似体の利用。

国際調査報告

International Publication No. PCT/JP 90/02127

1. CLASSIFICATION BY SUBJECT MATTER of the invention according to the International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC	
Int. Cl. <sup>5</sup>	A 61 K 37/02
2. FIELD SEARCHED	
Classification System	Classification System
Int. Cl. <sup>5</sup>	A 61 K
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>1</sup>	
Category <sup>2</sup>	Relevance to the Invention <sup>3</sup>
A	US, A, 3856936 (J.A. VICK et al.) 24 December 1974
4. CERTIFICATION	
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Issuing of the International Search Report
13 March 1991 (13.03.91)	22 April 1991 (22.04.91)
International Searching Authority	Director of Administrative Office
European Patent Office	

From PCT/JP 90/02127 (published 1991.05.23)

国際調査報告

EP 9002127  
SA 42385

This document is the patent family member relating to the patent application filed in the above-mentioned international search report. The numbers are as contained in the European Patent Office EDP file as of 01/01/91. The European Patent Office is in no way liable for their particularity which are merely given for the purpose of information.

Patent document class. & search report	Publication date	Patent family number(s)	Publication date
US-A- 3856936	24-12-74	None	

For more details about this report, see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/91

第1頁の続き

④発 明 者    サエルマルク, トルベン

スウェーデン国, エス-211 30    マルモエー, グスタフ    アドル  
フス    トルク    43